

GUIA PARA RESOLUÇÃO DE PROBLEMAS

PROBLEMA	POSSIVEL CAUSA	AÇÃO CORRETIVA
Não ocorreu aglutinação no poço "Patient Test" wells	a) problemas na coleta e pós coleta b) esqueceu de usar diluente para reconstituir o material liofilizado c) ao misturar sangue e o liofilizado, com o misturador, provocou abrasão do cartão, pelo excesso de força aplicada inadequada quantidade de sangue em relação ao EDTA, ao coletar a amostra uso de concentrado de hemácias como amostra, em vez de sangue total.	a) ver procedimento nº 9 b) ver procedimento nº 8 c) ver procedimento nº 10 ver procedimento nº1 e limitações do procedimento nº 6 diluir amostra 1:1 com solução fisiológica e reiniciar o teste

References:

1. Kristensen A, Feldman B: Canine and Feline Transfusion Medicine. The Veterinary Clinics of North America, W.B. Saunders 25:6, November 1995
2. Auer L, Bell K: The AB blood group system in cats. *Anim Blood Grps Biochem Genet* 12:287, 1981
3. Oakley DA, Giger U: Recent advances in canine and feline transfusion medicine. Proc 3rd ACVIM Tech Forum: 4-6, 1997
4. Jacomet L, Montoro A, Rivero M, Giger U: Frecuencia de los distintos grupos sanguíneos en gatos de Buenos Aires, Argentina. *Revista de Medicina Veterinaria*, Vol. 78, Nbr. 6 (1997), p. 428-431
5. Giger U, Akol KG: Acute hemolytic transfusion reaction in an Abyssinian cat with blood type B. *J Vet intern Med* 4:315, 1990
6. Bucheler J, Giger U: Transfusion of type A and B blood in cats. Proc 8th ACVIM Forum, Washington DC, May 1990, p 1113
7. Wilkerson MJ, Wardrop KJ, Giger U, Myers KM: Two cat colonies with A and B blood types and a clinical transfusion reaction. *Feline Pract* 19:22, 1991
8. Auer L, Bell K, Coates S: Blood transfusion reactions in the cat. *J Am Vet Med Assoc* 180:729, 1982
9. Hubler M, Kaelin S, Hagen A, Fairburn A, Canfield P, Ruesch P: Feline neonatal isoerythrolysis in two litters. *J Small Anim Pract* 28:833, 1987
10. Cain GR, Suzuki Y: Presumptive neonatal isoerythrolysis in cats. *J Am Vet Med Assoc* 187:46, 1985
11. Gandolfi RC: Feline neonatal isoerythrolysis: A case report. *Calif Vet* 42:March/April, 1988
12. Giger U: Feline blood groups and incompatibility reactions. Proc 8th ACVIM Forum, Washington DC, May 1990, p319
13. Andrews GA, Chavey PS, Smith JE, Rich L: N-Glycolylneuraminic Acid and N-Acetylneuraminic Acid Define Feline Blood Group A and B Antigens. *Blood*, 79,9:2485-2491, 1992
14. Butler M, Andrews GA, Smith JE: Reactivity of lectins with feline erythrocytes. *Comp Haematol Int* 1:217, 1991
15. Kohn B, Niggemeier A, Reitemeyer S, Giger U: Blutgruppenbestimmung bei der Katze mit Hilfe einer neuen Testkartenmethode. *Kleintierpraxis* 42, Heft 12 (1997), Seiten 941-950
16. Knottenbelt C, Mackin A: Blood transfusions in the dog and cat. *In Practice*, March 1998, p. 110-114

RapidVet is a registered trademark of dmslaboratories, inc.

RVHF-014

dmslaboratories,inc.

2 Darts Mill Road
Flemington, NJ 08822
Tel: (908) 782-3353 / 800 567-4367
Fax: (908) 782-0832
www.rapidvet.com

Importador:JMR Trading Ltda
CNPJ:11.857.347/0001-71
Nº Registro no MAPA:117/10-PR
Endereço:Rua Santa Alves Petra,173
CEP:83.325-170 Pinhais-Paraná-Brasil
Responsável Técnica: CRMV PR nº3288
Margareth Carvalho S.Agottani
SAC:info@jmrtrading.com.br
www.vpdagnostico.com.br

Teste para determinar grupo sanguíneo

Uso "in vitro"

RapidVet®-H
Feline

Descrição e Finalidade: RapidVet-H (Feline) tem a finalidade de determinar o grupo sanguíneo Tipo A, Tipo B, ou Tipo AB em gatos. Como a prática da medicina transfusional veterinária, sofreu enorme crescimento nos últimos anos, tem aumentado a importância de identificar o tipo sanguíneo em felinos.

Em particular, a demanda para a identificação de grupos sanguíneos está em ascensão, porque só predeterminando o tipo sanguíneo do animal, em uma necessidade futura de transfusão, pode-se evitar erros potencialmente fatais.¹

Um sistema de grupo sanguíneo consistindo de dois antígenos expressados sozinhos ou em combinação, tem sido descrito em gatos: Tipo A, Tipo B e Tipo AB.¹⁻⁴ Os antígenos não estão relacionados com os antígenos ABO humanos e são definidos por soros aloimune felino. A incidência do grupo sanguíneo varia entre as raças. Grupos sanguíneos em gatos são herdados de forma autossômica simples, com Tipo A dominante sobre Tipo B. A maioria dos gatos são Tipo A, e cerca de um terço destes, contém naturalmente, uma baixa titulação de anticorpo anti-B. Todos os gatos Tipo B, contém naturalmente, uma alta titulação de anticorpos anti-A. Uma pesquisa recente nos Estados Unidos, mostrou que a porcentagem de gatos com o antígeno B, variou dependendo da raça². Essas raças com alta frequência de sangue do tipo B estão descritas a seguir:

RAÇA	FREQUÊNCIA DE TIPO B (%)	RAÇA	FREQUÊNCIA DE TIPO B (%)
Abyssinian	14	Japanese Bobtail	16
Birman	16	Persian	14
British SH	40	Scottish Fold	18
Cornish Rex	34	Somali	17
Devon Rex	41	Sphynx	19

Gatos Tipo AB são raros e uma vez que tais gatos têm ambos os antígenos A e B, na membrana do eritrócito, a Tipagem sanguínea dos gatos, é importante na prática médica veterinária, para evitar-se reações nas transfusões^{1-8, 15-16} em gatos com eritrócitos A ou B. **Gatos Tipo B** apresentam uma reação anafilática sistêmica imediata e catastrófica (hipotensão, bradicardia, apnéia, micção, defecação, vômito e depressão neurológica grave) e sinais hemolíticos (hemoglobinemia e hemoglobinúria), quando recebem sangue tipo A, pois tem naturalmente, alta titulação de anticorpo anti-A. **Gatos Tipo A**, como contém baixa titulação de anticorpos anti-B, irão apresentar apenas uma leve reação quando recebem sangue Tipo B, mas mesmo assim, pode fazer a diferença na recuperação em uma situação médica, pois as hemácias transfundidas, nestes casos, têm uma vida útil curta. Estes gatos com eritrócitos A, não vão apresentar reação quando transfundidos pela 1ª vez com sangue do tipo B, mas vão, como resultado, desenvolver títulos moderados de anticorpos anti-B que resultarão em uma **reação grave** após uma transfusão incompatível subsequente.

Determinação de grupos sanguíneos em gatos, também é importante na tomada de decisões na reprodução e na compreensão de problemas médicos em gatinhos. Isoeritrólise neonatal, pode ocorrer, quando há incompatibilidade de grupo sanguíneo entre sangue materno e fetal^{1-4, 9-12, 15-16}. Devido aos anticorpos anti-A, presentes em grande quantidade em gatos com Tipo sanguíneo B, a isoeritrólise neonatal pode ocorrer em gatinhos Tipo A, resultantes de acasalamento de uma gata Tipo B com macho de sangue Tipo A. O anticorpo maternal anti-Tipo A está no colostro, onde pode ser absorvido pelo gatinho recém-nascido, e, consequentemente, destruir os seus eritrócitos. Clinicamente, os gatinhos podem parecer normais no nascimento, mas desenvolvem sinais depois de nascidos, desvanecem e morrem nos primeiros dias de vida. A determinação do grupo sanguíneo da mãe e do macho antes do acasalamento, juntamente com o aconselhamento genético adequado, pode minimizar a isoeritrólise neonatal.

Princípio e Explicação do Teste: O RapidVet-H (Feline) baseia-se na reação de aglutinação que ocorre, quando um eritrócito que contém tanto Tipo A, Tipo B, ou um antígeno do tipo AB na superfície da sua membrana, interage com um anti-soro específico liofilizado. O material liofilizado no cartão de teste não é facilmente visível.

Eritrócitos do Tipo A são caracterizados pela formação do antígeno glicolípido NeuGc₂G_{D3} na superfície de sua membrana¹². RapidVet-H (Feline) utiliza um anticorpo monoclonal murino, comprovadamente específico para este antígeno acima, e está liofilizado na placa de teste. A molécula de anticorpo lhe confere a capacidade de ligar-se e aglutinar antígenos específicos para o sangue do Tipo A.

Eritrócitos do Tipo B são caracterizados pela formação de ácido neuramínico NeuAc₂G_{D3}, presente no gangliósídeo e não tem NeuGc, estes presentes no eritrócito Tipo A.¹³ Foi estabelecida a especificidade de ligação da NeuAc₂G_{D3} com a lectina, *Triticum vulgare*¹⁴. RapidVet O-H (feline) utiliza a lectina de *Triticum vulgare* para detectar o sangue do Tipo B.

Em ambos os casos, o anti-soro liofilizado no cartão de teste, é reconstituído e bem misturado com o sangue total do doente. Todo Tipo A de eritrócitos, reagem com seu anti-soro específico, causando aglutinação, todos os eritrócitos do tipo B reagem da mesma forma, todos os eritrócitos Tipo AB reagem com ambos os anti-soros, causando aglutinação em todos os casos. Os resultados são identificados visualmente.

NOTA: Uma pequena porcentagem de gatos doentes e de gatos saudáveis auto-aglutinam. Se a auto-aglutinação ocorrer, PARAR o teste e realizar os procedimentos normais de lavagem de células, antes de prosseguir. **Instruções para lavagem das hemácias podem ser encontradas no nosso site www.vpdagnostico.com.br**

Reagentes e Materiais: Este kit contém reagentes e materiais listados abaixo. Guardar na posição vertical.
Cartão de Teste. Cada cartão tem três poços visualmente definidos. Isto inclui um poço identificado como "Auto-Agglutination Saline Screen" para verificar a auto-aglutinação da amostra, e dois poços identificados como "Patient Test" - Tipo A e Tipo B. Os cartões são embalados individualmente em polietileno, contendo cada um sachê com sílica gel, 1 Frasco conta-gotas com diluente, contendo 0.02 mol/L de Tampão Fosfato (PBS) pH 7.4. O conta-gotas dispensa 40 µL em cada gota.

Pipetas e Misturadores. Cada embalagem contém 2 pipetas de plástico e 3 misturadores.

Armazenagem e Estabilidade:

1. O Cartão de teste de aglutinação, é estável à temperatura ambiente (20-25 °C) por um período de 24 meses, a partir da data da fabricação. Cada cartão de teste vem impresso data da validade.
2. O diluente é estável à temperatura ambiente durante 24 meses a partir da data da fabricação. Cada frasco de diluente vem impresso a data da validade.
3. Se o teste for executado adequadamente, pelo menos um dos poços "Patient Test" vai aglutinar. Assim, o teste é auto-controlado.

NOTA: Cada kit RapidVet-H (Feline) vem impresso a data da validade, que representa a data de menor vencimento entre os componentes do kit. Alguns componentes podem ter datas de validade individual mais tardia, mesmo assim, a sua utilização em outros kits não é recomendada.

PROCEDIMENTO DO TESTE:

1. **Coletar** o sangue do paciente para seringa ou tubo revestido internamente com EDTA, ou contendo solução EDTA como anticoagulante. O teste requer apenas 150 µL de sangue total, mas o tubo ou seringa deve ser completado de modo que o EDTA fique com concentração adequada. Se o teste não for realizado imediatamente, não deve-se adicionar conservantes como CPDA (citrato-fosfato-dextrose-adenina) no sangue.
2. **Remover** o cartão de teste de sua embalagem plástica. Guarde a embalagem plástica e reserve a sílica gel.
3. **Identificar** o nome/número do cão e a data do teste no cartão.
4. **Colocar** o cartão de teste em uma superfície plana.
5. **DISPENSAR** 1 gota de diluente (40 µL), do frasco com tampão, no poço "Auto-Agglutination Saline Screen"
6. **Aspirar** uma pequena quantidade de amostra do paciente para a pipeta e goteje (50 µL) no mesmo poço marcado "Auto-Agglutination Saline Screen" (Ver nota 1 para o uso correto da pipeta). Com o misturador (levemente) pressionado para baixo, e com a parte plana, misturar os materiais dentro da totalidade do poço, por cerca de 10 segundos.

7. NOTA

Uma pequena percentagem de gatos doentes e de gatos saudáveis auto-aglutinam. Se a auto-aglutinação ocorrer, PARAR o teste e realizar os procedimentos normais de lavagem de células, antes de prosseguir (método no site www.vpdagnostico.com.br) Se a auto-aglutinação for leve, pode ser possível determinar se o gato é Tipo A ou Tipo B, apesar da auto-aglutinação. No entanto, devido à dificuldade de diferenciação entre a auto-aglutinação e os resultados de Tipo A ou Tipo B, em tais circunstâncias, este deve ser tentado somente em situações de emergência, quando o tempo e / ou o pessoal necessário para lavar as células não está disponível.

Isto é particularmente difícil para gatos, dado que o caráter de aglutinação normal no poço A e B é bem diferente. Se o operador entende claramente e aceita a maneira de proceder, pode utilizar-se dos seguintes critérios:

Se a aparência da aglutinação em um dos poços A ou B é semelhante à observada na auto-aglutinação, o gato é provável negativo para esse tipo de sangue. Se não ocorrer tanto para A e B, o teste deve ser interrompido, porque o gato não pode ser negativo, tanto para o A e B. Se a aglutinação em um dos poços é maior do que no poço de auto-aglutinação, o gato é provável positivo para aquele tipo de sangue. Se caso ocorrer aglutinação em ambos os poços, como é raro gatos com AB, não é possível chegar a uma conclusão.

8. **DISPENSAR** 1 gota de diluente (40 µL) em cada poço a ser usado. O diluente auxilia na reconstituição do material liofilizado.
9. **Agitar** suavemente o tubo que contém a amostra do paciente para suspender qualquer material sólido.
10. **Aspirar** uma pequena quantidade de amostra do paciente para a pipeta e gotejar uma gota (50 µL) em cada um dos dois poços marcados com "Patient Test". Utilizando um novo misturador e pressionando para baixo com a parte plana espalhar e misturar os materiais, na totalidade dos poços, durante cerca de 10 segundos. Utilizar outro misturador, espalhar e misturar da mesma forma, os materiais, dentro da totalidade do outro poço por cerca de 10 segundos.

11. **ADICIONAR uma segunda gota de diluente no poço marcado "Tipo A". Não utilize o misturador.**
12. Movimentar o cartão, usando um movimento transaxial, por não mais do que um minuto, tempo menor se a aglutinação já ocorrer no poço "Patient Test", cuidar para que os materiais estejam homogeneizando e "girando" dentro de cada poço. Tenha cuidado para não misturar material de um poço para outro.
13. Ler os resultados e registrar os poços que ocorreram as aglutinações.
14. Depois que o cartão foi lido, tirar uma fotografia digital para ter um registro permanente.

Alternativamente, inclinar o cartão a um ângulo de 10°, para que o excesso de sangue corra para o lado dos poços. Colocando a parte superior da placa em cima do sachê com dessecante, vai conseguir isso. Depois que os materiais no cartão secarem, coloque o cartão na embalagem plástica para se ter um registro permanente

PROCEDIMENTO NOTA 1: Utilização da pipeta: Segure o tubo de plástico entre o polegar e o dedo indicador perto da extremidade fechada, apertar a bolha e não liberar a pressão. Segurar o tubo de amostra verticalmente e colocar a extremidade aberta do tubo de plástico abaixo da superfície da amostra. Solte a pressão dos dedos para tirar a amostra.

Em seguida, segurar a pipeta numa posição perpendicular diretamente sobre o poço. Apertar suavemente a bolha e gotejar uma gota dentro do poço (50 µL). Cada pipeta é concebida para expelir ligeiramente um excesso de 50 µL para compensar uma pequena quantidade de amostra retida pelo agitador. Repita o procedimento para o segundo poço.

Use cada pipeta para apenas uma amostra do paciente, em seguida, descartar. Sob nenhuma circunstância a pipeta deve ser usada para mais do que uma amostra, para evitar contaminação cruzada e resultados do teste imprecisos.

Resultados: Se o ensaio foi executado corretamente, a aglutinação deve ter ocorrido em pelo menos um dos poços marcados com "Patient Test".

Se a amostra do paciente mostrar aglutinação no Tipo A, o gato testado é do grupo sanguíneo A. Se a amostra do paciente mostrar aglutinação no Tipo B, o gato testado é do grupo sanguíneo B. Se a amostra do paciente mostra aglutinação em ambos os poços, o gato testado é do grupo sanguíneo AB.

Qualquer aparência fina ou granular desenvolvida após 1 minuto, deve ser desconsiderada na determinação dos resultados.

Se o paciente está muito anêmico e é do Tipo A, os pontos de ligações dos antígenos, podem saturar com o anticorpo devido a reticulação e aglutinação. Isto é devido ao bloqueio esteérico do anticorpo anti-A. Se o paciente está anêmico, execute o teste sem o uso de diluente nos poços do paciente.

Limitações do procedimento:

1. Executar corretamente os procedimentos informados, para obter resultados precisos.
2. Sempre use uma nova pipeta para cada amostra e um novo agitador para cada poço. Reutilizar qualquer dispositivo fará com que ocorram contaminações cruzadas e resultados imprecisos.
3. A estabilidade dos componentes individuais do kit varia. Armazenar os componentes, conforme indicado nos rótulos. Não use nenhum componente além da data de validade indicada. O uso de materiais vencidos podem causar resultados não confiáveis.
4. O diluente é fornecido num frasco com tampa de rosca, para minimizar a contaminação bacteriana. O diluente de outras fontes não deverá ser utilizado.
5. A integridade física da amostra do paciente é crítico para os resultados corretos.
6. Sempre coletar uma seringa ou tubo contendo EDTA cheios. Sangue de menos irá causar uma concentração demasiado elevada de EDTA na amostra a ser testada.

Características de Desempenho: Um total de 2116 amostras de eritrócitos felinos foram testados no ensaio de RapidVet-H (Felino) utilizando o anticorpo monoclonal anti-A. Destes, 2075 eram do tipo A, 31 eram do tipo B e 10 foram determinados como sendo o tipo AB. Os resultados estão em conformidade com os resultados obtidos pelo cruzamento de correspondência com anti-soros conhecidos e por outros métodos de referência.

Eliminação: Eliminar todos os materiais biológicos, pipetas e agitadores em um recipiente de risco biológico.

Controle de Qualidade: Todos os reagentes e materiais incorporados neste kit foram controlados sua qualidade por procedimentos de teste padrão, usando um programa de controle de qualidade de rotina durante o fabrico.